

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 8 月 7 日 (07.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/063894 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/22,
45/00, 48/00, A61P 3/10, 3/04, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/07599

(22) 国際出願日: 2002 年 7 月 26 日 (26.07.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-23554 2002 年 1 月 31 日 (31.01.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 門脇 孝 (KAD-
OWAKI, Takashi) [JP/JP]; 〒215-0023 神奈川県 川崎
市麻生区片平 3 丁目 16-14 Kanagawa (JP). 山内 敏正
(YAMAUCHI, Toshimasa) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都

文京区向丘 1 丁目 3-1-306 Tokyo (JP). 加門 淳司 (KA-
MON, Junji) [JP/JP]; 〒114-0024 東京都北区西ヶ原 3 丁
目 7-8-302 Tokyo (JP). 脇 裕典 (WAKI, Hironori) [JP/JP];
〒225-0002 神奈川県 横浜市青葉区美しが丘 1 丁目
21 6-5-102 多摩プラザ団地 Kanagawa (JP). 永井 良三
(NAGAI, Ryozo) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区本郷
2 丁目 32-2-1204 Tokyo (JP). 木村 哲 (KIMURA, Satoshi)
[JP/JP]; 〒162-0815 東京都新宿区筑土八幡町 5 丁目
2 Tokyo (JP). 富田 基郎 (TOMITA, Motoo) [JP/JP]; 〒
225-0002 神奈川県 横浜市青葉区美しが丘 3 丁目 44-38
Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE
PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT
OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1
丁目 3 番 6 号共同ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

規則 4.17 に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新
規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: INSULIN RESISTANCE IMPROVING AGENTS

(54) 発明の名称: インスリン抵抗性改善剤

(57) Abstract: It is intended to provide insulin resistance improving agents which contain, as the active ingredient, the C-terminal side spherical region of adiponectin C, adiponectin or genes thereof. It is also intended to provide remedies for type 2 diabetes which contain, as the active ingredient, the C-terminal side spherical region of adiponectin C, adiponectin or genes thereof. Thus, insulin resistance, which is induced by fat-rich diet and accompanied by obesity, can be improved and type 2 diabetes amounting the major part of diabetes can be treated.

(57) 要約:

アディポネクチンの C 末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子
を有効成分とするインスリン抵抗性改善剤を提供するものである。また本発明は、
アディポネクチンの C 末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子を
有効成分とする 2 型糖尿病治療剤を提供するものである。

本発明によれば、高脂肪食により誘発され、肥満を伴うインスリン抵抗性が改
善され、糖尿病のほとんどを占める 2 型糖尿病が治療できる。

502,051



WO 03/063894 A1



— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する
申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

インスリン抵抗性改善剤

技術分野

本発明は、肥満症、糖尿病、心血管系疾患の予防及び治療に有用なインスリン抵抗性改善剤及び2型糖尿病治療剤に関する。

背景技術

従来、脂肪組織は、単なる余剰エネルギーの貯蔵庫として知られていたが、最近の研究により各種の生理活性物質を産生し、分泌することが明らかになってきた。当該生理活性物質は一括してアディポサイトカインと呼ばれており、これにはレプチン、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、プラスミノゲン活性化因子阻因子1型(PAI-1)、アディプシン、レジスチン等が知られている。これらのアディポサイトカインのうち、レプチン、TNF- α 、レジスチン等は脂肪細胞から分泌されてインスリン感受性を制御する可能性が示されている。

最近見出されたアディポサイトカインの一種にアディポネクチンがある。このアディポネクチンは、4つのグループにより、異なる方法で独立に同定されたものである。アディポネクチンcDNAは、3'-末端を揃えたヒト脂肪組織cDNAライブラリーの大規模なランダムシーケンシングにより単離された。Ac r p 3 0あるいはAd i p o Qと名づけられたマウスアディポネクチンcDNAは、各々マウス3T3-L1及び3T3-F442A細胞の分化の前後で、ディファレンシャル・ディスプレイ法によりクローニングされたものである。更に、ヒトアディポネクチンは、ゼラチン結合タンパク28として血漿から精製された。肥満/糖尿病マウス及びヒトでは、アディポネクチンのmRNA発現とその血漿レベルは有意に低下している。L o d i s hらは最近、Ac r p 3 0のタンパク

分解産物がマウス筋の脂肪酸酸化を増大させ、体重減少を引き起こすことを報告した。

しかしながら、アディポネクチンが実際に糖尿病に有効か否かは全く知られていない。

高脂肪食により誘発され、肥満を伴うインスリン抵抗性は、糖尿病及び心血管系疾患の主要なリスクファクターであり、このインスリン抵抗性を改善するか否かが糖尿病治療薬として有用か否かを判断するうえで極めて重要である。

従って本発明の目的は、インスリン抵抗性を改善し、糖尿病治療に有用な新たな薬物を提供することにある。

発明の開示

そこで本発明者は、インスリン感受性を改変したマウスモデル、肥満と2型糖尿病のマウスモデル等を用いてアディポネクチンの作用を検討したところ、アディポネクチンの発現低下又は欠乏がインスリン抵抗性の発症原因であること、更にはアディポネクチン、その一部の投与又はそれらの遺伝子の導入がインスリン抵抗性及び2型糖尿病の治療に有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はアディポネクチンのC末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子を有効成分とするインスリン抵抗性改善剤を提供するものである。

また本発明は、アディポネクチンのC末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子を有効成分とする2型糖尿病治療剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、db/dbマウスのWAT中のアディポネクチンmRNA量(a)及び血清アディポネクチンレベル(b)を示す図である。

図2は、db/dbマウスのグルコース負荷試験時の、グルコース曲線下面積値（a）及びインスリン曲線下面積値（b）を示す図である。

図3は、3T3L1脂肪細胞中のアディポネクチンmRNA量を示す図である。

図4は、WAT中のLPLmRNA量を示す図である。

図5は、精巣上体WAT重量を示す図である。

図6は、WAT消失を示すマウス腹腔像を示す図である。

図7は、抗アディポネクチン抗体によるイムノブロッティングの結果を示す図である。

図8は、インスリン抵抗性指数を示す図である。

図9は、マウス骨格筋におけるCD36、ACO、UCP2及びPPAR- α の各mRNA発現を示す図である。

図10は、マウス肝におけるCD36、ACO、UCP2及びPPAR- α の各mRNA発現を示す図である。

図11は、マウス骨格筋におけるインスリンリセプター（IR）とインスリンリセプター基質（IRS）-1のインスリン誘発性のチロシンリン酸化及びインスリン（Ins）刺激によるAktリン酸化を示す図である。

図12は、C57及びdb/dbマウスのグルコース負荷試験時の血清アディポネクチンレベルを示す図である。

図13は、C57及びdb/dbマウスのグルコース負荷試験時のグルコース曲線下面積を示す図である。

図14は、C57及びdb/dbマウスのグルコース負荷試験時のインスリン曲線下面積を示す図である。

図15は、KK及びKKA^yマウスのグルコース負荷試験と基の血清アディポネクチンレベルを示す図である。

図16は、KK及びKKA^yマウスのグルコース負荷試験時のグルコース曲線下面積を示す図である。

図17は、KK及びKKA^yマウスのグルコース負荷試験と基のインスリン曲線下面積を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明に用いられるアディポネクチンは、既にクローニングされており [Maeda, K et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 221, 286-296 (1996)、Nakano, Y. et al, J. Biochem. (Tokyo) 120, 802-812 (1996)]、既知の手段により入手できる。配列番号1及び2にヒトアディポネクチンのアミノ酸配列及び塩基配列を示す。アディポネクチンは、N末端側のコラーゲン様配列 (cAd) とC末端側の球状領域 (gAd; 配列番号1中、アミノ酸番号114~239又は111~242) から構成されているが、C末端側の球状領域 (gAd) は、完全長アディポネクチンよりも強力な高血糖及び高インスリン血症改善作用を有し、特に好ましい。また、マウスアディポネクチンのアミノ酸配列及び塩基配列を配列番号3及び4に示す。マウスアディポネクチンのcAdは45~109 (アミノ酸番号) であり、gAdは110~247 (アミノ酸番号) である。また、本発明においては、配列番号1~4に示すアミノ酸配列及びgAd領域を示すアミノ酸配列を有する蛋白質だけでなく、これらのアミノ酸配列の一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加したアミノ酸配列を有する蛋白質であってもアディポネクチンとしての作用を有するものであれば用いることができる。当該一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加したアミノ酸配列には、配列番号1と80%以上、好ましくは90%相同性のあるものが含まれる。

本発明で用いられる遺伝子としては、配列番号1に示されるアディポネクチンをコードする遺伝子及びgAdをコードする遺伝子が挙げられる。また、これらの遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る塩基配列を有する遺伝子も用いることができる。

アディポネクチン又はその一部のポリペプチドは、それが存在する細胞から分離することもできるが、アディポネクチンをコードする遺伝子がすでにクローニングされているので、DNA組み換え技術、すなわち、当該遺伝子を用いて調製した発現ベクターを利用し、形質転換した細胞を用いて調製してもよい。

後記実施例に示すように、インスリン感受性を変化させたマウスモデルでは、アディポネクチン発現低下がインスリン抵抗性と同時に生じている。アディポネクチンは、肥満マウスの筋及び肝のトリグリセリド含量を低下させることによりインスリン抵抗性を低下させる。この作用は、筋での脂肪酸燃焼とエネルギー消費の両者に関与する分子の発現増加によるものである。また、脂肪組織萎縮マウスにおけるインスリン抵抗性は、アディポネクチン又はレプチンいずれか単独でも改善するがアディポネクチンとレプチンを併用することにより完全に改善された。肥満及び脂肪組織萎縮のいずれのマウスモデルにおいても、アディポネクチン低下がインスリン抵抗性の発現に関与している。従ってアディポネクチンの投与はインスリン抵抗性改善と2型糖尿病の新しい種類の治療剤となることが明らかになった。

本発明の医薬をヒトを含む哺乳類に投与するには、前記有効成分に薬学的に許容される担体を加えて、種々の投与形態の医薬組成物とすることができる。かかる投与形態としては注射用製剤が好ましい。また薬学的に許容される担体としては、蒸留水、溶解補助剤、安定化剤、乳化剤、緩衝剤等が挙げられる。また、これら医薬の投与量は、疾患、性別、体重等により変化するが、アディポネクチン量として0.1 μ g ~ 10 mg / 日程度であろう。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

A. 方法

(1) 化学物質

PPAR- γ アゴニスト ロジグリタゾン (rosiglitazone) PPAR- γ /RXR阻害剤HX531は、文献に従って合成した (Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 47, 1778-1786 (1999)、Diabetes 47, 1841-1847 (1998))。

(2) 動物

PPAR- γ マウスはすでに報告した方法で作成した (Mol. Cell 4, 597-609 (1999))。その他の全ての動物は日本クレアから購入した。6週齢のマウスに、記載のごとく粉状の餌を給餌し、薬剤は食餌に混ぜて与えた (Mol. Cell 4, 597-609 (1999))。

(3) RNA調製、ノーザンブロット解析及びイムノブロットティング

全RNAは、TRIzol (GIBCO-BRL社) を用いて、製品のプロトコールに従って組織から調製した。各群5~10匹のマウスから得たRNAをプールし、一部をラットACO (T. Hashimotoより)、マウスCD36、UCP2、PPAR- α (K. Motojimaより)、又はマウスアディポネクチンcDNAプローブによるノーザンブロット解析に使用したJ. Biol. Chem. 273, 16710-16714 (1998)、Diabetes 47, 1841-1447 (1998)。各バンドの放射活性を定量し、28S rRNA量でロード量の差を補正したのち、各mRNAの倍数変化を計算した。血清アディポネクチンレベルは、組換えアディポネクチンをスタンダードとして、ゼラチン結合タンパク質28に対するポリクローナル抗体 (ヒトアディポネクチンC端の20アミノ酸のN端に余分のシステインを加えたペプチド、CYADNDNDSTFTGFLLYHDTNに対する抗体として作成) (J. Biochem. (Tokyo) 120, 802-812 (1996)) を使用するイムノブロットティングで測定した。免疫沈降反応とイムノブロットティングに使用した手順はすでに報告した方法 (Mol. Cell Biol. 16, 3074-30

84 (1996)) に従った。3回の独立した実験のうち1回のデータを代表として示す。

(4) 血液サンプルアッセイ

血漿グルコース、血清FFA及びトリグリセリドレベルは、それぞれグルコースB-test、非エステル化脂肪酸 (NEFA) C-test 及びトリグリセリドL-type (和光純薬) で測定した。血漿インスリンはインスリン免疫アッセイ (Morinaga Institute of Biological Science) で測定した (Diabetes 47, 1841-1847 (1998))。レプチンはELISA-based Quantikine Mマウスレプチン免疫アッセイキット (R&D Systems) を使用して、製品のプロトコールに従ってアッセイを行った。

(5) 6xHis-アディポネクチン融合タンパク質の生成

各々完全長のマウスアディポネクチンcAd又はgAdをpQE-30細菌発現ベクター (Qiagen社) に導入した。JM-109における、ヒスチジンタグ付きアディポネクチン、cAd及びgAdの発現を、増殖培養液にイソプロピル β -チオガラクトピラノシドを加えて誘発した。標準法を用いて細菌抽出液を調製し、ニッケルイオンアガロースカラム (Diabetes 47, 1841-1847 (1998)) から溶出させることにより融合タンパク質を精製した。混在する可能性のあるエンドトキシンの除去には、ActiClean Etoxアフィニティカラム (Sterogene Bioseparations社) を使用した。

(6) アディポネクチン又はレプチン投与

文献 (Nature 401, 73-76 (1999)) 記載のごとく、腹腔内注入又は持続全身注入によりアディポネクチン又はレプチンをマウスに投与した。各マウスの背部皮下に1個のAlzet微小浸透圧ポンプ (model 1002, Alza社) を挿入した。各図に示した1日用量のマウス組換えレプ

チン (Sigma 社) 又はアディポネクチンを、総容量 0.1 ml の PBS に溶解して、このポンプで 12 日間送達投与した。

(7) インスリン抵抗性指数

グルコース値 ($1 \text{ mg/ml} = 1 \text{ cm}$) とインスリン値 ($1 \text{ ng/ml} = 1 \text{ cm}$) 各々の累積平均高さに時間 ($60 \text{ 分} = 1 \text{ cm}$) を掛けて、グルコース曲線及びインスリン曲線の面積を算出した (Am. J. Physiol. 240, E482–E488 (1981))。インスリン抵抗性指数は、グルコース負荷試験におけるグルコース及びインスリン面積 $\times 10^{-2}$ の積から算出した (Mol. Cell 11, 4, 597–609 (1999))。結果は各対照値に対する割合で示した。

(8) 脂質代謝と ACO の酵素活性

[1- ^{14}C] パルミチン酸からの [^{14}C] CO_2 生成の測定は、肝と筋の切片を用いて文献 (Diabetes 47, 1841–1847 (1998)) 記載のごとく行った。肝と筋からホモジネートを作成し、抽出用液 ($\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 2 : 1$) を用いて組織トリグリセリド含量を測定した。肝と筋の残りはただちに液体窒素中で凍結し、ACO 活性の測定を実施するまで -80°C で保存した。肝と筋の軽量ミトコンドリア分画中の ACO 活性は、ロイコージクロロフルオレセインの H_2O_2 依存性酸化に基づくアッセイにより測定した (Diabetes 47, 1841–1847 (1998))。

B. 結果

(1) アディポネクチン発現とインスリン感受性の関係

肥満ではアディポネクチンが低下するとの報告があることから、肥満及びインスリン抵抗性における、アディポネクチン発現変化の役割について検討を行った。この目的のために、脂肪蓄積を促進するとともにインスリン抵抗性を低下させる PPAR- γ アゴニスト ロジグリタゾンを使用した。

結果を図 1、図 2 及び図 3 に示す。図 1 には、高炭水化物食 (HC)、高脂肪

食のみ (HF) 又は高脂肪食+ロジグリタゾン (HF+Rosiglitazone) で処置した db/db マウスの、WAT アディポネクチン mRNA 量 (図 1 a) 及び血清アディポネクチンレベル (図 1 b) を示す。

また図 2 には、高炭水化物食 (HC)、高脂肪食のみ (HF) 又は高脂肪食+ロジグリタゾン (HF+Rosiglitazone) の処置を行った db/db マウスのグルコース負荷試験時の、グルコース曲線下面積値 (図 2 a) 及びインスリン曲線下面積値 (図 2 b) を示す。結果は無投与 HC 食マウス値に対する割合で示した。無投与 HC 食 db/db マウスの基礎グルコースレベル (グルコース負荷試験のゼロタイム時) は $244.8 \pm 23.3 \text{ mg/dl}$ だった (図 2 a)。各バーは平均値 \pm s.e. ($n=5 \sim 10$) を示す。* $P < 0.05$; ** $p < 0.01$; 無投与 HC 食マウスと比較。

また、図 3 には、 $1 \mu\text{M}$ ロジグリタゾンで 24 時間処理した (Rosiglitazone)、又は処理しなかった (−) 3T3L1 脂肪細胞中のアディポネクチン mRNA 量を示す。

これらの結果から、高脂肪食は、高血糖 (図 2 a) と高インスリン血症 (図 2 b) を有するマウスの、アディポネクチンの白色脂肪組織 (WAT) における mRNA レベル (図 1 a) と血清レベル (図 1 b) を低下させた。ロジグリタゾンはアディポネクチンの WAT における mRNA レベル (図 1 a) と血清レベル (図 1 b) を有意に上昇させ、同時に高血糖 (図 2 a) と高インスリン血症 (図 2 b) を改善した。しかしながら、db/db マウスでは、脂肪組織容積 (ピークル投与: $2.72 \pm 0.11 \text{ g}$; Rosiglitazone 投与: $2.84 \pm 0.16 \text{ g}$) と体重 (ピークル投与: $46.5 \pm 0.70 \text{ g}$; Rosiglitazone 投与: $47.9 \pm 1.0 \text{ g}$) のわずかな増加が見られた。野生型対照 (C57) でも同様の結果が得られた。in vitro の分化 3T3L1 脂肪細胞においても、ロジグリタゾンはアディポネクチン発現を増加させた (図 3 c)。これらのデータより、アディポネクチン mRNA の発現は PPAR- γ 依存性経路により一部調節されており、

肥満よりもインスリン感受性の調節に密接に関与していることがわかる。

(2) 脂肪組織の欠乏とアディポネクチンの関係

アディポネクチン発現とインスリン感受性の因果関係を明らかにするために、脂肪組織の消失ひいてはアディポネクチンの枯渇を試みた。PPAR- γ /RXR活性を高度に低下させることにより、脂肪組織を欠くマウスモデルを作成した(図4～図8)。

すなわち、PPAR- γ ^{-/-}マウスにHX531を6週間投与(+)又は無投与(-)下で、組換え完全長アディポネクチン(Ad)、gAd又はレプチン(Lep)を所定の用量(μ g/日)投与した。特に示さない限り、投与は持続全身注入(pump)にて実施し、6週間のHX531投与期間の最後12日間に、高脂肪食(HF)を与えながら併用投与した。

図4にはWAT中のLPL mRNA量を示す。図5には精巣上体WAT重量を示す。図6にはWAT消失を示すマウス腹腔像を示す。図7には血清アディポネクチンレベルは、組換えアディポネクチンをスタンダードとして、抗アディポネクチン抗体によるイムノブロッティングで測定した結果を示した。図7中、50 μ g Adをマウスに腹腔内(ip)注入した場合の血清アディポネクチンレベルをレーン9に示す。図8には、インスリン抵抗性指数を示す。結果は、高脂肪食を与えられた無投与PPAR- γ ^{-/-}マウス値に対する割合として示した。高脂肪食を与えられた無投与PPAR- γ ^{-/-}マウスの基礎グルコースレベル(グルコース負荷試験のゼロタイム時)は 110.7 ± 12.8 mg/dlだった。各バーは平均値 \pm s. e. (n=5~10)を示す。* P<0.05; ** p<0.01; 無投与ないしHX531を6週間単独投与したPPAR- γ ^{-/-}マウス又はレプチンとアディポネクチンを併用投与したPPAR- γ ^{-/-}マウスと比較した。

その結果、RXRアンタゴニストHX531のようなPPAR- γ /RXR阻害剤をPPAR- γ ^{-/-}マウスに3週間投与したところ、リポタンパクリパーゼ(

LPL)をはじめとするWAT内PPAR- γ /RXR応答性遺伝子の発現が著明に低下し(～90%以上; 図4)、PPAR- γ /RXR活性が高度に低下した。この処置を4週間継続することにより、観察可能なWATは消失した(図5と6)。このような脂肪組織の消失は、発現がPPAR- γ /RXR活性依存性である、WAT内のトリグリセリド蓄積に関与する分子の発現低下によると考えられる。

アディポネクチンは脂肪組織萎縮マウスの血清から完全に消失したが、対照マウス血清では、アディポネクチンに対する抗体により、アディポネクチンが35-kDタンパク質として検出された(図7、レーン6と7)。

また、脂肪組織萎縮マウスにおける組織トリグリセリド含量及び血清遊離脂肪酸レベルを測定した。

すなわち、PPAR- $\gamma^{\Delta\Delta}$ マウスにHX531を6週間投与(+)又は無投与(-)下で、PPAR- $\gamma^{\Delta\Delta}$ マウスに組換え完全長アディポネクチン(Ad)、gAd又はレプチン(Lep)を所定の用量(μ g/日)投与した。投与は持続全身注入にて実施し、6週間のHX531投与期間(6週)の最後12日間に、高脂肪食(HF)を与えながら併用投与した。

その結果、表1に示すように脂肪組織萎縮マウスでは、高インスリン血症と高血糖(図8)に加えて、血清遊離脂肪酸(FFA)上昇、トリグリセリドレベル上昇、骨格筋と肝の組織トリグリセリド含量上昇も認められた。

表 1

脂肪組織萎縮マウスにおける組織トリグリセリド含量及び血清遊離脂肪酸レベル

	—		HX531		
	—	Ad50	—	Ad50	gAd2.5
骨格筋TG含量 (mg/g組織)	6.24±0.43	5.47±0.32*	15.96±1.47	7.74±0.65**	3.88±1.74**
肝TG含量 (mg/g組織)	8.02±1.18	6.45±0.26*	19.36±1.23	16.19±0.72**	13.81±0.91**
血清FFA (mEq/L)	0.42±0.03	0.35±0.02*	1.48±0.25	0.61±0.13**	0.43±0.14**
血清TG (mg/dl)	82.6±8.9	60.5±6.0*	201.4±25.3	106.6±18.1**	100.3±17.5**

平均±s. e. (n=5~10)、*:P<0.05, **:P<0.01 (非処置マウス又は6週間HX531単独投与マウスとの対比)

(3) アディポネクチンによる脂肪組織萎縮マウスのインスリン抵抗性の改善。

脂肪組織萎縮マウスのインスリン抵抗性の発現におけるアディポネクチン欠乏の役割を検討するために、これらのマウスに対するアディポネクチンの投与を行った。生理的濃度の組換えアディポネクチンの持続全身注入（図7、レーン6-8）により、高血糖と高インスリン血症は有意に改善した（図8）。

(4) アディポネクチンの球状ドメインの作用

アディポネクチンは、N末端側のコラーゲン様配列（cAd）とC末端側の球状領域（gAd）から構成されている（配列番号1参照）。いずれのドメインがこれらの生理活性を発揮するのかについて解析した。その結果、gAdは、高血糖と高インスリン血症を、完全長のアディポネクチンよりも強力に改善した（図8）。アディポネクチンのC末端部に対する抗体により認識される25-kDタンパク質が非常に少量ながら血清中にも存在し、完全長アディポネクチンがタンパク分解処理を受けることが示唆された。

(5) アディポネクチン/レプチン欠乏によるインスリン抵抗性の改善

脂肪組織萎縮性糖尿病におけるインスリン抵抗性は、組織のインスリン感受性を増強させるアディポサイトカインの欠乏によると考えられる。上記の結果は、アディポネクチンがこのようなアディポサイトカインの1つであることを示す。

生理的濃度のアディポネクチン投与では、脂肪組織を欠くマウスのインスリン抵抗性を完全には改善しなかった。レプチンも上記のアディポサイトカインの1つであることが知られている。これらのマウスでは血清レプチンレベルは検出不能だった（上限：0.2 ng/ml）。これらのマウスに生理的濃度のレプチンを投与したところ、部分的ではあったがインスリン抵抗性の軽減が実際に認められた（図8）。そして、アディポネクチンとレプチンの生理的濃度での併用投与は、インスリン抵抗性を相乗的に、ほぼ完全に消失させた（図8）。

（6）アディポネクチンによるトリグリセリド含量低下

アディポネクチンが糖尿病治療効果を発揮するメカニズムを明らかにするために、個々の器官に対するアディポネクチンの作用を検討した。

すなわち、マウス骨格筋（図9）及び肝（図10）における、脂肪酸転位酵素（FAT）/CD36、ACO、UCP2及びPPAR- α の各mRNAを示す。図11には骨格筋における、インスリンリセプター（IR）とインスリンリセプター基質（IRS）-1のインスリン誘発性のチロシンリン酸化及びインスリン刺激によるAktリン酸化を示す。HX531は0.1%となるように食餌に混ぜて投与した。マウスはインスリン1U/g体重の投与/非投与下で2分間刺激した。細胞溶解液は、Mol. Cell. Biol. 16, 1074-3084（1996）記載の抗体により免疫沈降反応（IP）実施後、イムノブロッティングを行った。

その結果、骨格筋では、低濃度のgAd投与は、脂肪酸輸送、脂肪燃焼及びエネルギー消費にそれぞれ関与する、CD36、アシルCoAオキシダーゼ（ACO）及び脱共役タンパク質（UCP）2などの分子の発現を増加させる（図9）。これらの過程は、続いて骨格筋中の組織トリグリセリド含量の低下をもたらす（表1）。これらの遺伝子の発現がPPARによって正に制御されている事が知られているので、これらの遺伝子発現変化の基礎にあるメカニズムとして考えられるのは、PPAR- α / γ の発現増加及び/又は内因性リガンドの増加などである。

る。実際、PPAR- α の発現増加が見られた(図9)。骨格筋とは対照的に、肝では低濃度gAd投与により、組織への脂肪酸輸送に関与するCD36などの分子の発現が低下したが(図10)、これにより肝への脂肪酸流入が減少し、肝のトリグリセリド含量が低下したと考えられる(表1)。従って、筋と肝ではいずれもトリグリセリド含量が低下していたものの、これら2つの組織における低下のメカニズムは明らかに全く異なる。これらのデータは、アディポネクチンが主として骨格筋に作用してFFAの流入と燃焼を増加させ、それにより筋のトリグリセリド含量を低下させることを示している。血清FFAとトリグリセリドのレベルが低下する結果として(表1)、肝のトリグリセリド含量は低下する。

(7) トリグリセリド含量の低下によるインスリン・シグナリングの改善

組織トリグリセリド含量が増加すると、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼのインスリン刺激による活性化、及びそれに続くグルコーストランスポータータンパク質4の細胞膜表面への移動とグルコースの取り込みが阻害され、インスリン抵抗性が生じると報告されている。従って、アディポネクチンを投与された脂肪組織萎縮マウスの、インスリン刺激による骨格筋Aktキナーゼのリン酸化の増強に加えて、インスリンリセプターとインスリンリセプター基質1のインスリン誘発性チロシンリン酸化の増強からも、筋のトリグリセリド含量の低下はインスリンシグナル伝達の改善に寄与すると考えられる(図11)。

(8) アディポネクチンによる肥満マウスのインスリン抵抗性改善作用

次に、肥満、高脂血症、インスリン抵抗性及び高血糖を特徴とする、2つの異なるマウス2型糖尿病モデル、db/db及びKK^Aマウス(アグーチを過剰発現したKKマウス)のインスリン抵抗性と糖尿病をアディポネクチンが改善するかどうかについて検討を行った。

その結果を図12~17に示す。すなわち、C57ないしdb/dbマウス(図12~14)あるいはKKないしKK^Aマウス(図15~17)の、グルコース負荷試験(GTT)時の血清アディポネクチンレベル(図12と15)と、

グルコース曲線下面積（図13と16）及びインスリン曲線下面積（図14と図17）の値を示す。マウスにはHC又はHF食が与えられ、無投与又は所定用量（ $\mu\text{g}/\text{日}$ ）のAdないしgAdを投与した。血清アディポネクチンレベルは、組換えアディポネクチンをスタンダードとして、抗アディポネクチン抗体によるイムノプロットングで測定した（図12と15）。結果は、HC食を与えられた無投与野生型マウス値に対する割合として示す（図13, 14, 16, 17）。HC食を与えられた無投与C57マウスの基礎グルコースレベル（GTTのゼロタイム時）は $62.3 \pm 3.1 \text{ mg/dl}$ （図13）、KKマウスでは $93.0 \pm 6.1 \text{ mg/dl}$ だった（図16）。各バーは平均値 \pm s. e.（ $n=5 \sim 10$ ）を示す。 $*P<0.05$ ； $**p<0.01$ ；C57対db/db、又はKK対KKA^y、HC対HF、もしくは無投与マウスと比較した。

その結果、高脂肪食を与えた野生型マウス（図12、レーン3）では、高炭水化物食を与えたマウス（図12、レーン1）に比べて、血清アディポネクチンレベルは低下していた。db/dbマウス（図12、レーン5と7）の血清アディポネクチンレベルも、高炭水化物食又は高脂肪食のいずれかを与えた野生型対照（図12、レーン1と3）に比べて低下していた。高脂肪食の野生型マウスの血清アディポネクチンレベル低値は、低用量の組換えアディポネクチンの持続全身注入により、高炭水化物食を与えられた野生型対照（図12、レーン1, 3, 4）のレベルまで部分的に回復し、高脂肪食（図13、レーン1, 3, 4）で誘発された高インスリン血症（図14、レーン1, 3, 4）と高血糖にも有意の改善が見られた。高炭水化物食又は高脂肪食のいずれかを与えられたdb/dbマウスの低い血清アディポネクチンレベルも、アディポネクチン補充により、対応する野生型対照のレベルまで部分的に回復し（図12）、レプチンリセプター欠乏により誘発された高血糖（図13）と高インスリン血症（図14）にもやはり有意の改善が見られた。KKA^yマウスとそれらの野生型対照を用いた際にも同様の結果が得られた（図15～17）。これらの結果は、高脂肪食、レプチンリセ

プター欠乏又はアグーチ過剰発現が、一部アディポネクチン低下によりインスリン抵抗性をもたらし、アディポネクチンが抗糖尿病薬として有用であることを示すものである。

また、アディポネクチン投与による、KKAYマウスの骨格筋中の脂肪酸酸化に対する影響を検討した。

KKAYマウスについての骨格筋及び肝中のアシル-CoAオキシダーゼ (ACO) 活性及び脂肪酸酸化、骨格筋及び肝中の組織トリグリセリド含量、並びに血清中の遊離脂肪酸及びトリグリセリドレベルを測定した。マウスには高脂肪食を与え、2週間表2記載の用量の完全長アディポネクチン (Ad) 又はアディポネクチンの球状ドメイン (gAd) を投与した。

その結果を表2に示す。

表 2

		—	Ad50	gAd2.5
ACO活性 (nmol/mg/min)	骨格筋	0.24±0.02	0.37±0.04*	0.42±0.04**
	肝	3.21±0.33	3.04±0.85	2.89±0.35
脂肪酸酸化 [¹⁴ C]パルミチン酸⇒CO ₂ (nmol/g/h)	骨格筋	2.52±0.23	3.95±0.58*	4.06±0.44*
	肝	3.31±0.38	2.92±0.29	2.89±0.21
TG含量 (mg/g 組織)	骨格筋	10.94±1.03	8.75±0.58*	8.06±0.61*
	肝	19.07±1.78	16.15±0.83*	16.04±0.91*
血清FFA (mEq/L)		1.29±0.12	0.67±0.09**	0.39±0.04**
血清TG (mg/dl)		200.2±20.8	101.3±19.7**	96.4±18.3**
直腸温度(°C)		36.7±0.3	37.3±0.2*	37.7±0.1**

平均±s.e. (n=5~10)、*:P<0.05, **:P<0.01 (非処置マウスとの対比)

(9) アディポネクチンによるβ酸化の促進

骨格筋では、アディポネクチン投与KKAYマウスは、β酸化関連酵素及びUCP2の発現増加を示した。アディポネクチン投与マウスのACO活性と脂肪酸燃焼は、骨格筋では上昇していたが、肝では上昇していなかった(表2)。これらの変化により骨格筋内トリグリセリド含量は減少し、血清のFFA及びトリグ

リセリドレベルの低下も伴った（表2）。このような血清FFAとトリグリセリドレベルの低下は、続いて、肝組織内への脂肪酸輸送に関与する分子の発現低下をもたらすと考えられ、更に肝の組織トリグリセリド含量も低下させる（表2）。

これに対して、正常のC57マウスにアディポネクチンを2週間投与した場合には、高脂肪食に伴うWAT重量（無投与マウス： 0.53 ± 0.03 g；gAd投与： 0.48 ± 0.04 g）と体重の増加は、ピークル（ピークル投与： 22.8 ± 2.0 g；gAd投与： 20.6 ± 2.1 g）に比べてわずかに低下したが、有意とはいえなかった。食餌摂取量は、いずれも高脂肪食を与えられたアディポネクチン投与マウスの方が対照に比べて多い傾向があり（ピークル投与： 5.71 ± 0.56 g/日；gAd投与： 6.28 ± 0.51 g/日）、直腸体温もアディポネクチン投与マウスの方が有意に高く（表2）、筋及び褐色脂肪組織での脂肪酸燃焼とエネルギー消費に関与する分子の発現増加と矛盾しなかった。しかしながら、レプチンリセプターを欠く¹db/dbマウスにおいても、アディポネクチンの抗糖尿病作用は減弱していなかった（図12～14）。更に、野生型マウスに対するアディポネクチンの投与は、WAT中のレプチン発現と血清レプチンレベル（ピークル投与： 11.1 ± 2.1 ng/ml；gAd投与： 10.4 ± 2.6 ng/ml）を変化させなかった。KK（ピークル投与： 15.1 ± 2.5 ng/ml；gAd投与： 13.4 ± 2.7 ng/ml）、KKA^y（ピークル投与： 61.5 ± 5.4 ng/ml；gAd投与： 57.9 ± 5.7 ng/ml）及びdb/dbマウス（ピークル投与： 153.9 ± 20.4 ng/ml；gAd投与： 145.2 ± 14.7 ng/ml）でもほぼ類似の血清レプチンレベル結果が得られた。これらの結果は、アディポネクチンがレプチンとは独立の経路で糖尿病治療作用を発揮することを示している。

産業上の利用可能性

本発明によれば、高脂肪食により誘発され、肥満を伴うインスリン抵抗性が改

善され、糖尿病のほとんどを占める 2 型糖尿病が治療できる。

請 求 の 範 囲

1. アディポネクチンのC末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子を有効成分とするインスリン抵抗性改善剤。
2. アディポネクチンのC末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子及びレプチン又はその遺伝子を有効成分とするインスリン抵抗性改善剤。
3. アディポネクチンのC末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子を有効成分とする2型糖尿病治療剤。
4. アディポネクチンのC末端側球状領域、アディポネクチン又はそれらの遺伝子及びレプチン又はその遺伝子を有効成分とする2型糖尿病治療剤。

図1

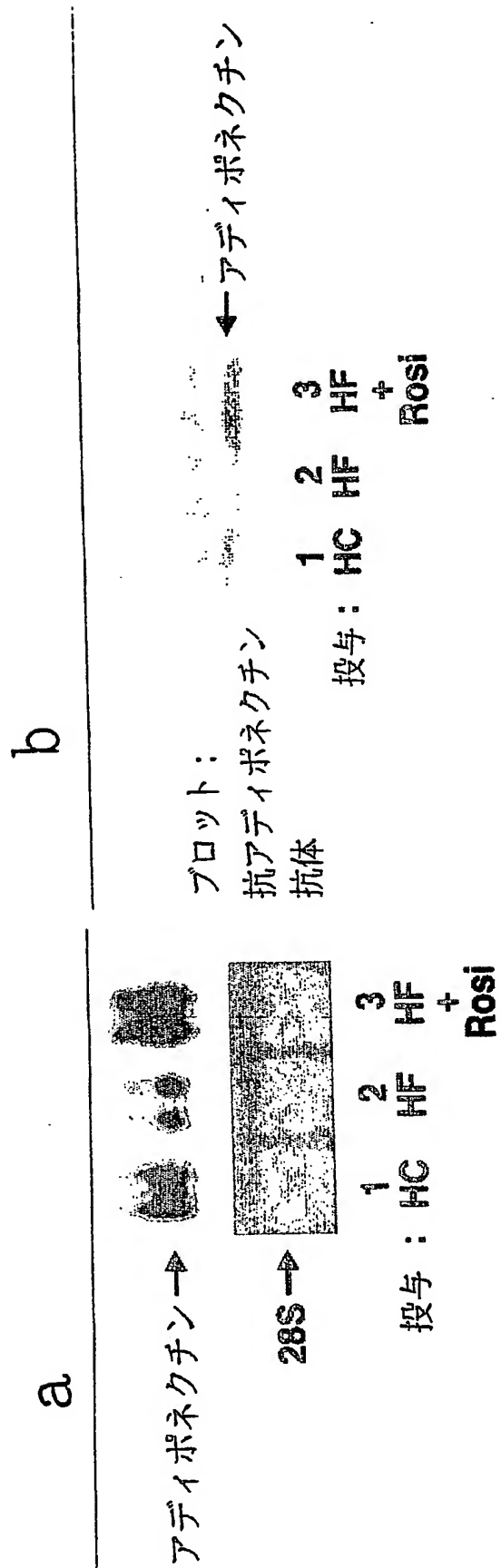


図 2

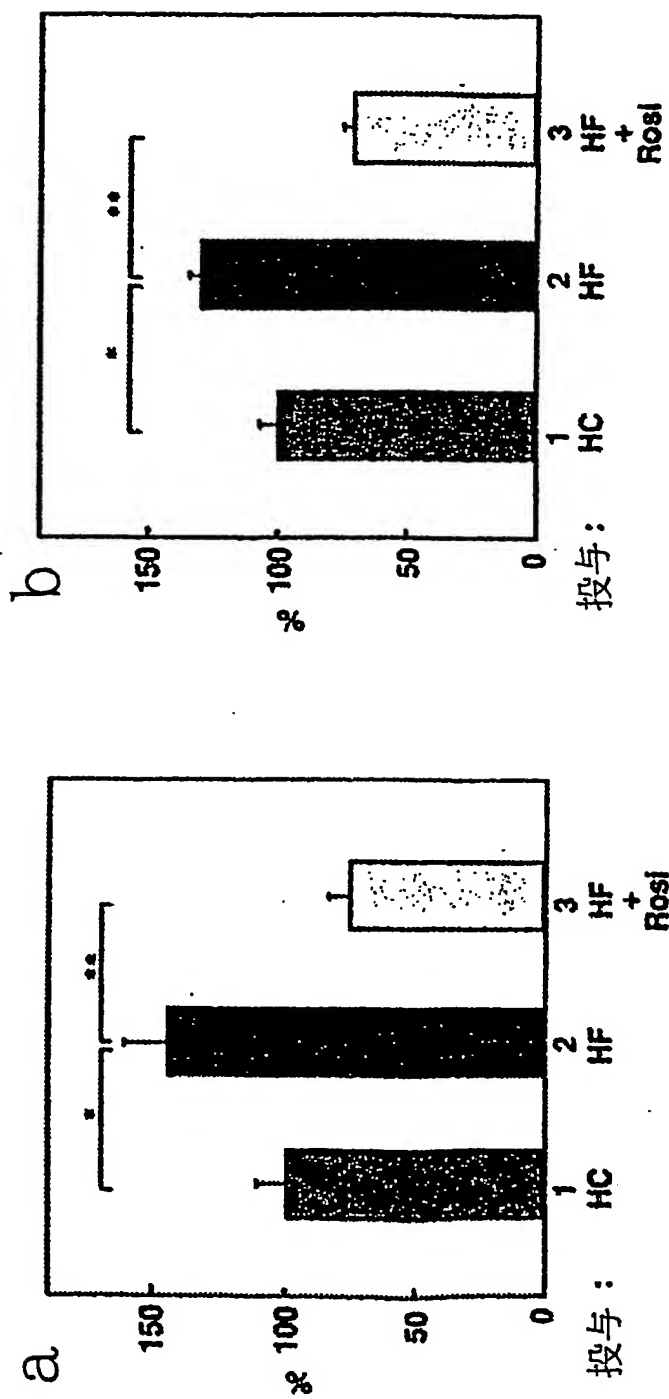


図 3

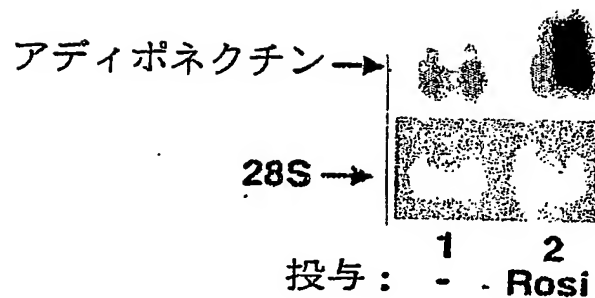


図 4

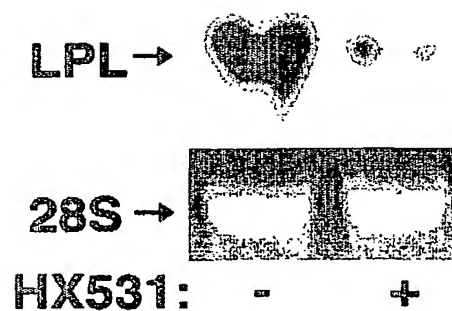


図 5

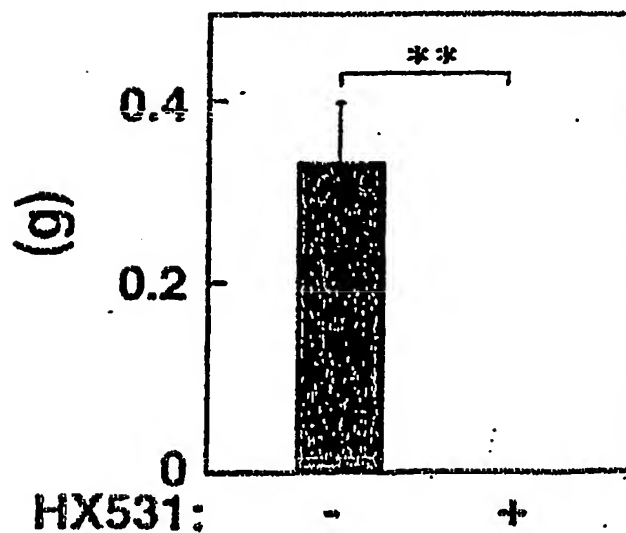
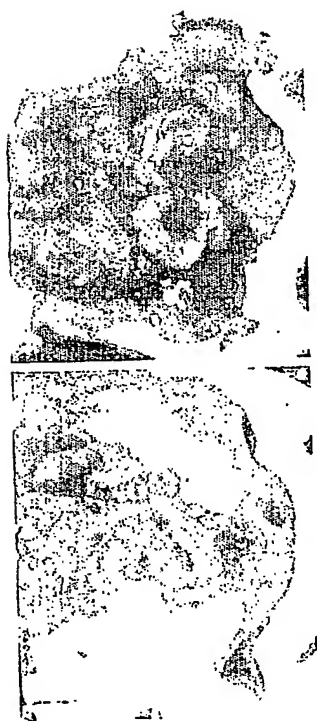


図 6



HX531:

-

+

図 7

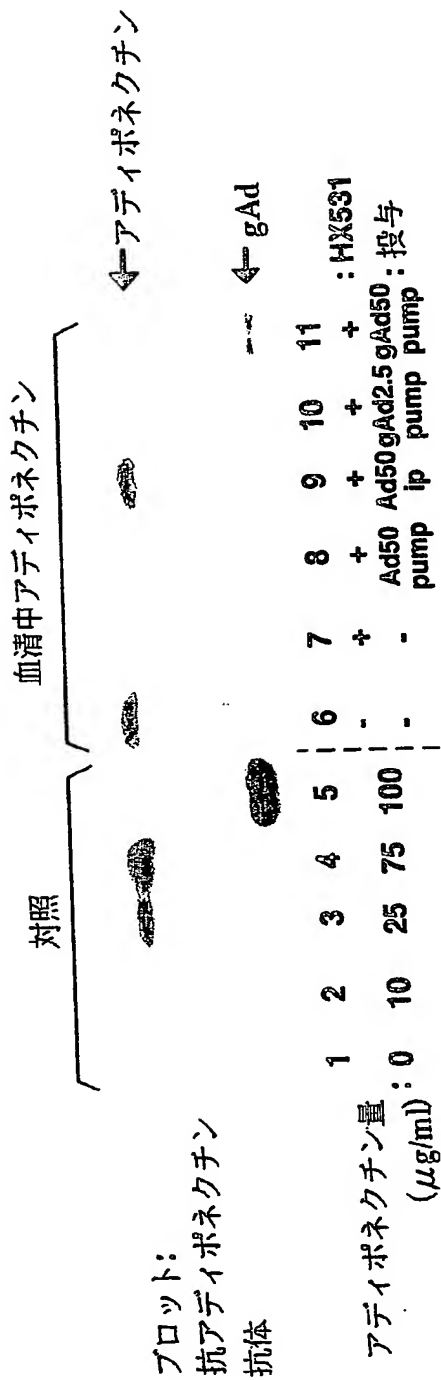


図 8

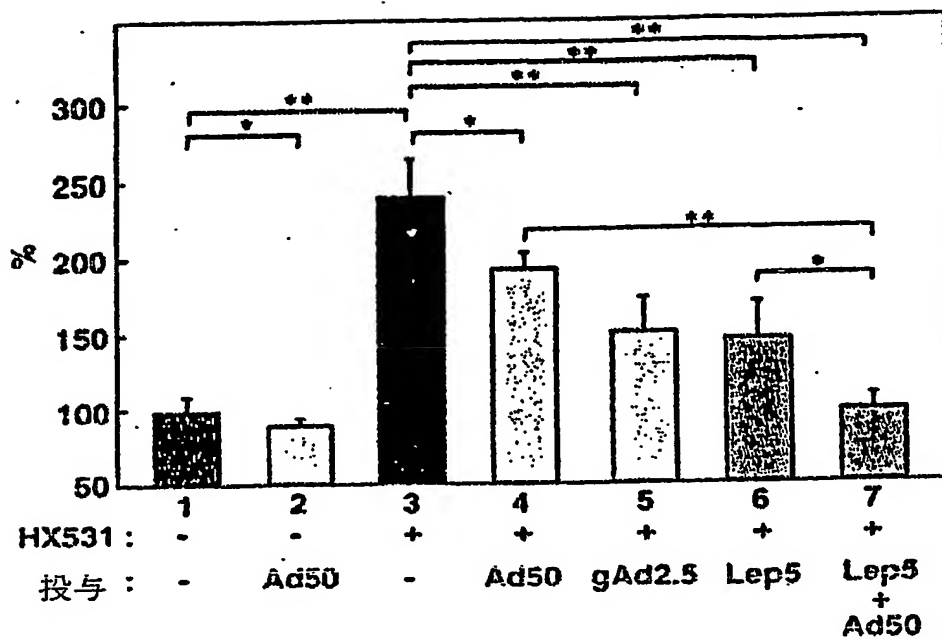


図 9

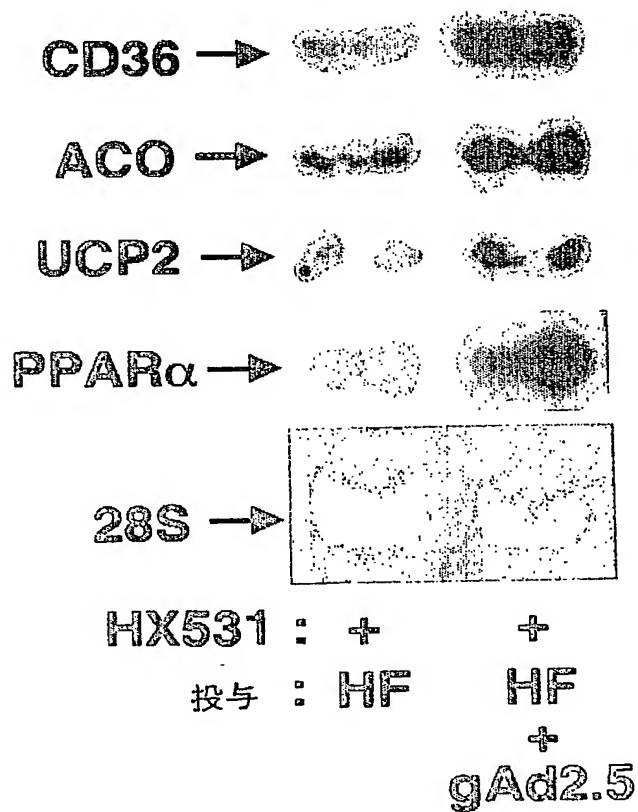


図 10

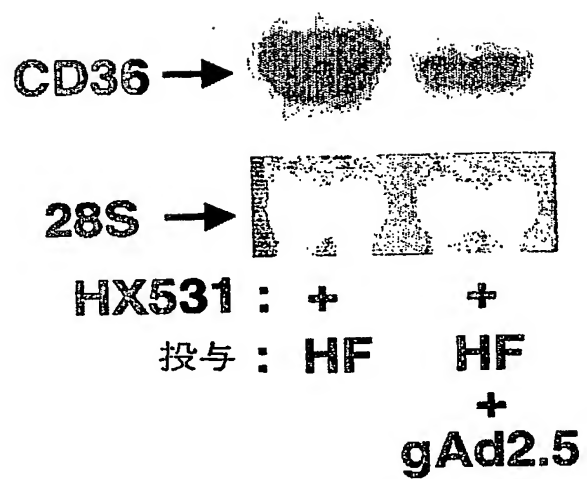


図 11

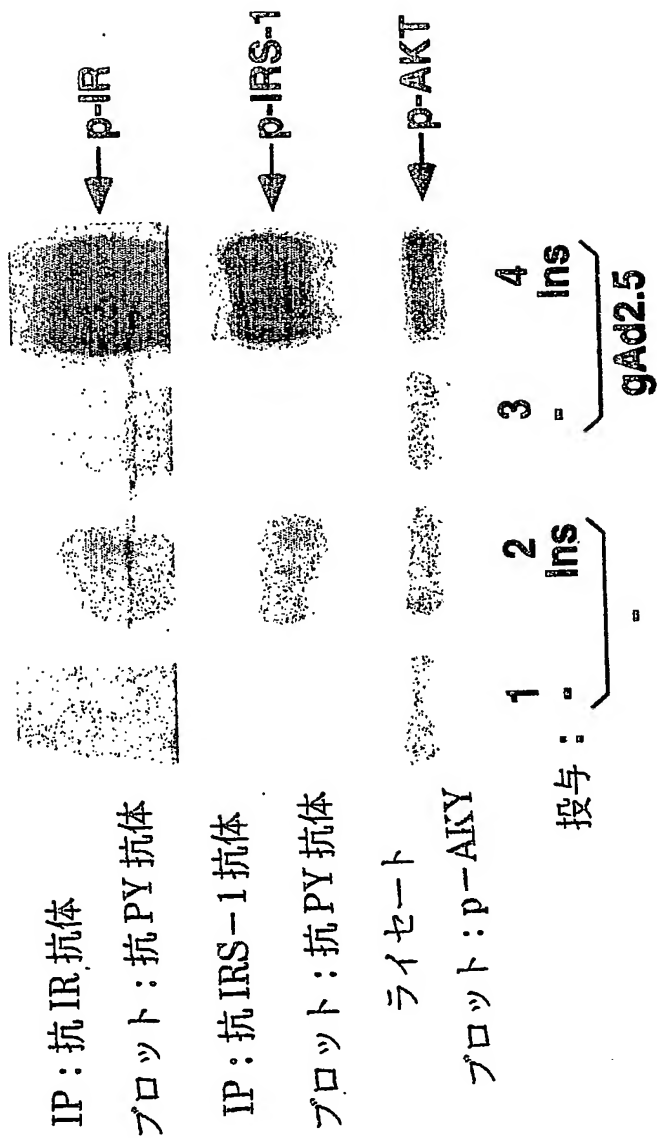


図 1 2

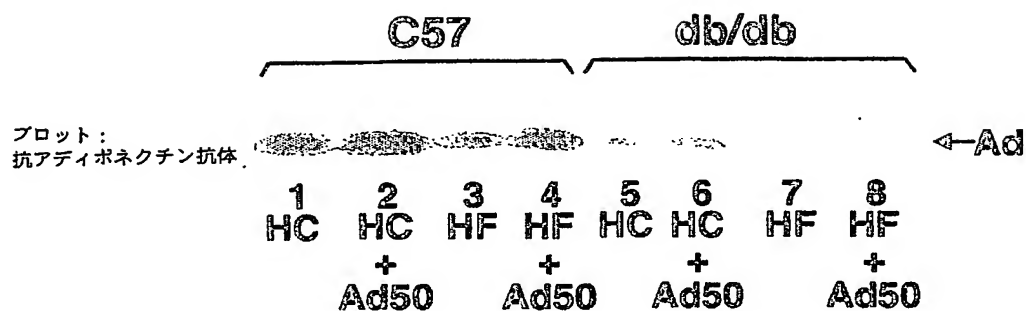
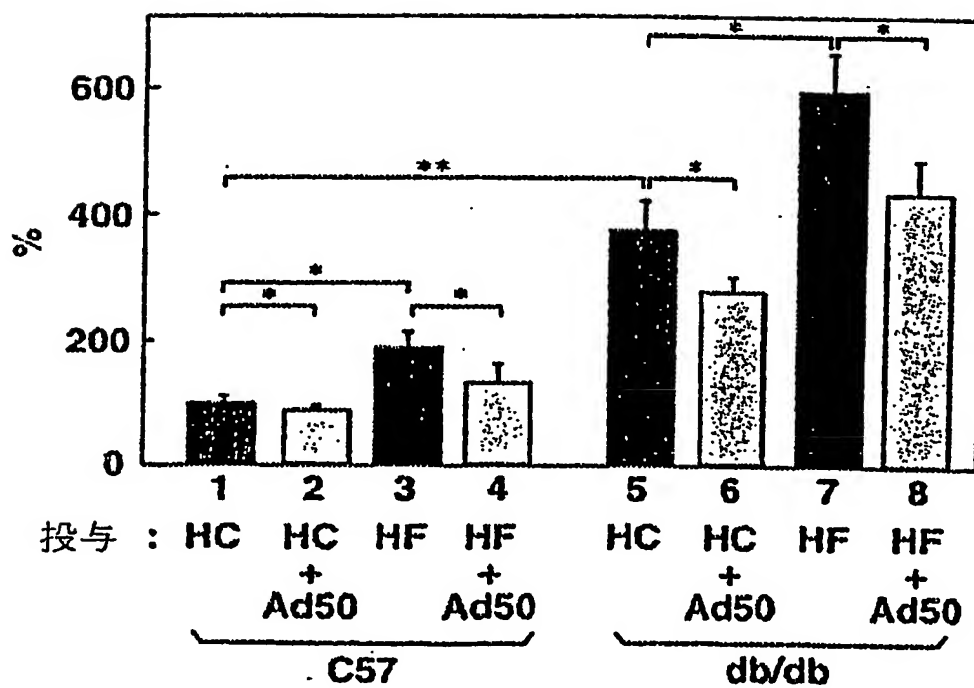


図 1 3



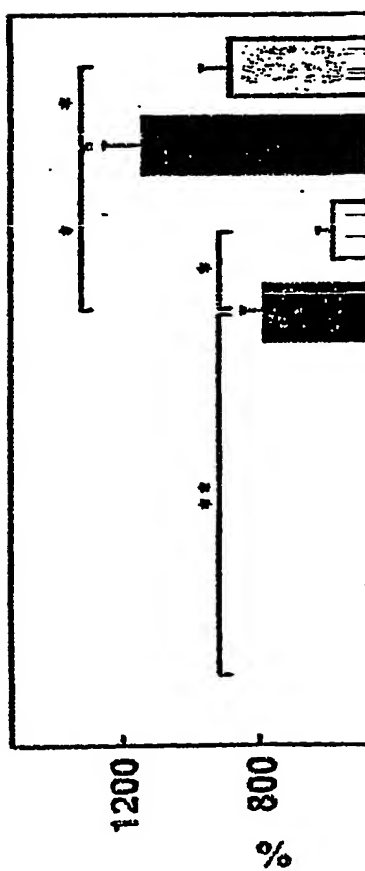


図 14

図 14

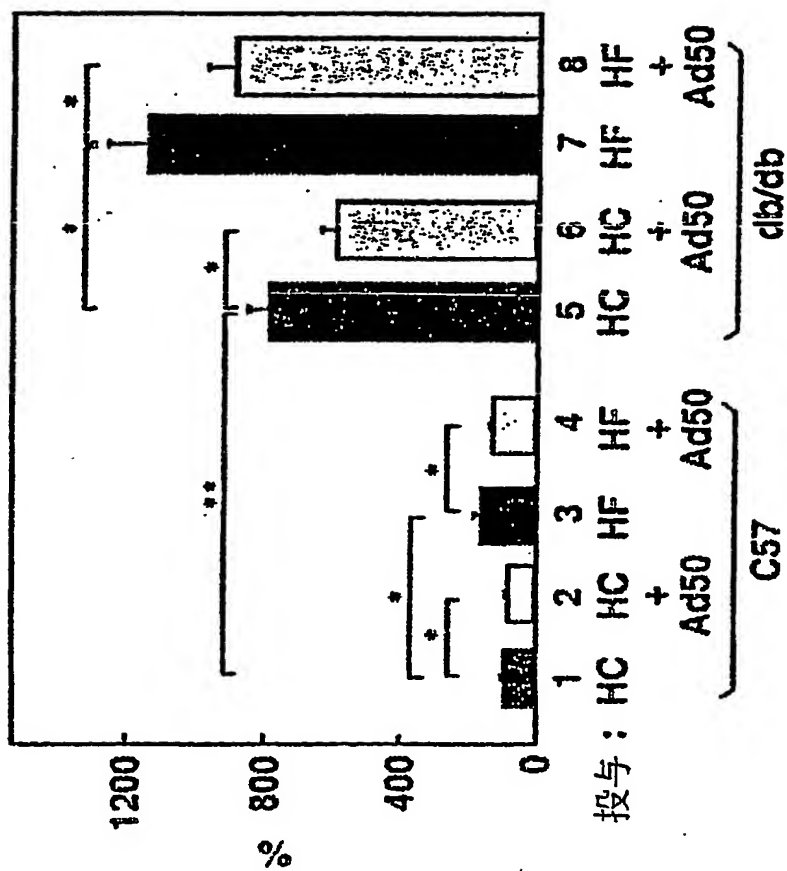


図 15

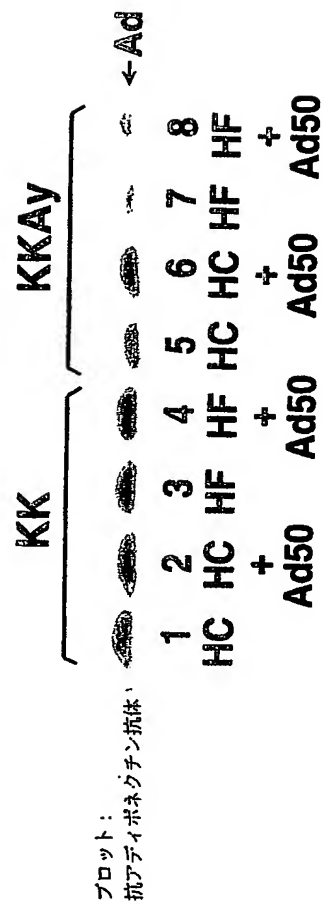


図 1 6

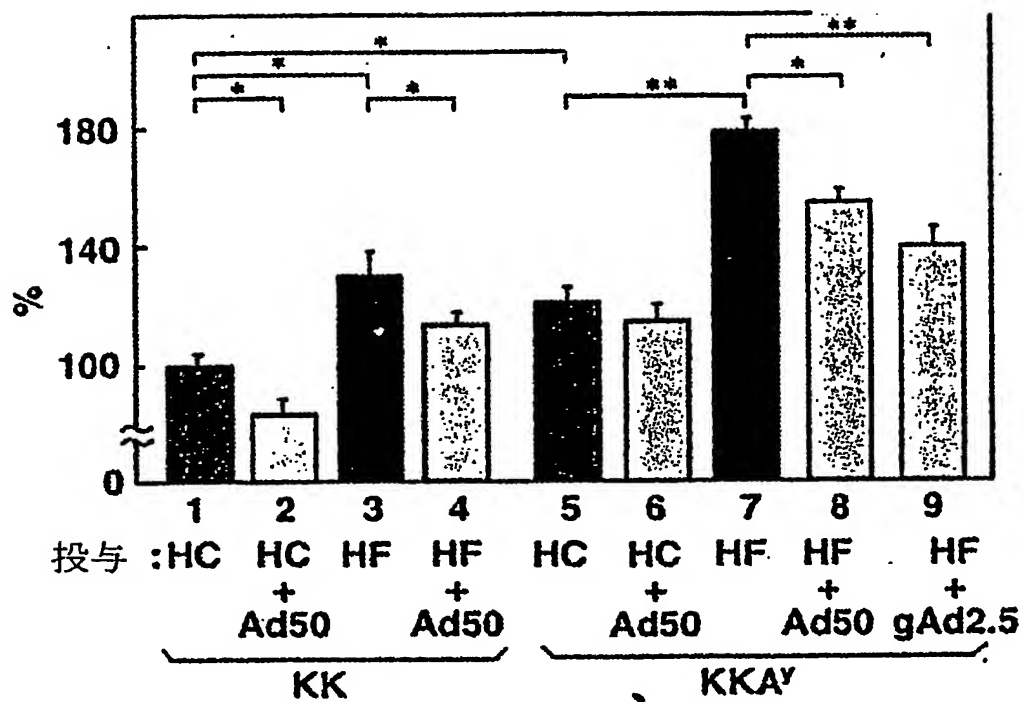
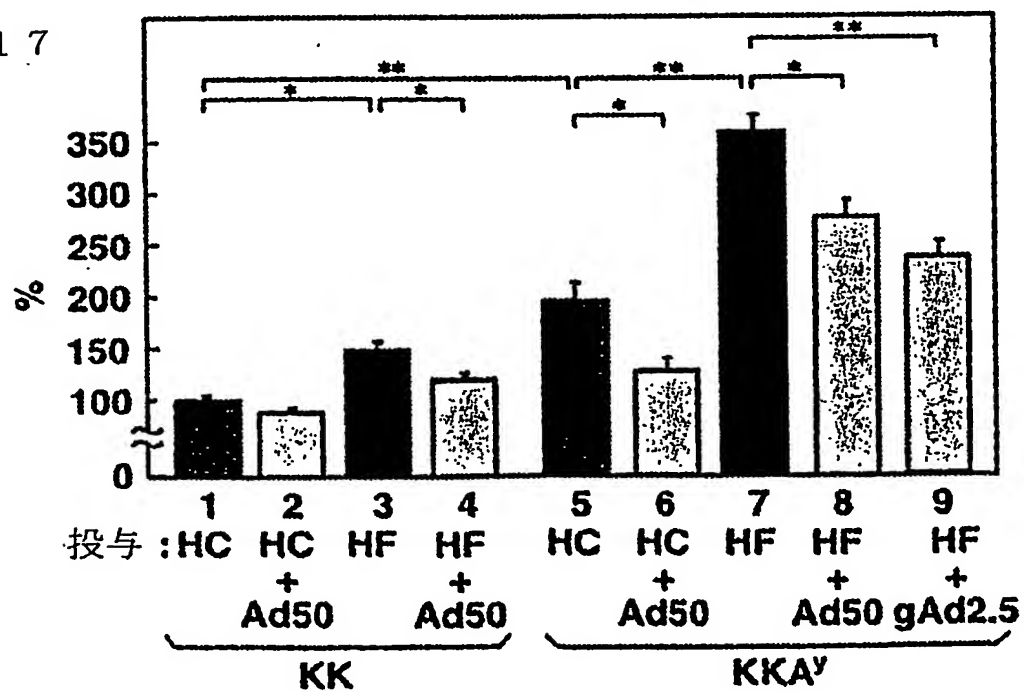


図 1 7



SEQUENCE LISTING

<110> Japan science and Technology Corporation

<120> Ameliorating Medicine for Iusulin Resistance

<130> JST0006

<140>

<141>

<150> JP P2002-023554

<151> 2002-01-31

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 735

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (735)

<400> 1

atg ctg ttg ctg gga gct gtt cta ctg cta tta gct ctg ccc ggt cat 48

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His

1

5

10

15

gac cag gaa acc acg act caa ggg ccc gga gtc ctg ctt ccc ctg ccc 96

Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro

20

25

30

aag ggg gcc tgc aca ggt tgg atg gcg ggc atc cca ggg cat ccg ggc 144

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly

35

40

45

cat aat ggg gcc cca ggc cgt gat ggc aga gat ggc acc cct ggt gag 192

His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu

50

55

60

aag ggt gag aaa gga gat cca ggt ctt att ggt cct aag gga gac atc 240

Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile

65

70

75

80

ggt gaa acc gga gta ccc ggg gct gaa ggt ccc cga ggc ttt ccg gga 288

Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly

85

90

95

atc caa ggc agg aaa gga gaa cct gga gaa ggt gcc tat gta tac cgc 336

Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg

100 105 110

tca gca ttc agt gtg gga ttg gag act tac gtt act atc ccc aac atg 384
Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met

115 120 125

ccc att cgc ttt acc aag atc ttc tac aat cag caa aac cac tat gat 432
Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp

130 135 140

ggc tcc act ggt aaa ttc cac tgc aac att cct ggg ctg tac tac ttt 480
Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe

145 150 155 160

gcc tac cac atc aca gtc tat atg aag gat gtg aag gtc agc ctc ttc 528
Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe

165 170 175

aag aag gac aag gct atg ctc ttc acc tat gat cag tac cag gaa aat 576
Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn

180 185 190

aat gtg gac cag gcc tcc ggc tct gtg ctc ctg cat ctg gag gtg ggc 624
Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly

195 200 205

gac caa gtc tgg ctc cag gtg tat ggg gaa gga gag cgt aat gga ctc 672

Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu

210

215

220

tat gct gat aat gac aat gac tcc acc ttc aca ggc ttt ctt ctc tac 720

Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr

225

230

235

240

cat gac acc aac tga

735

His Asp Thr Asn

245

<210> 2

<211> 244

<212> PRT

<213> Homosapiens

<400> 2

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His

1

5

10

15

Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro

20

25

30

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly

35

40

45

His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu

50

55

60

Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile

65 70 75 80
Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
85 90 95
Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100 105 110
Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
115 120 125
Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
130 135 140
Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
145 150 155 160
Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165 170 175
Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180 185 190
Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
195 200 205
Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu
210 215 220
Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr
225 230 235 240
His Asp Thr Asn

<210> 3

<211> 1276

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(789)

<400> 3

ctctaaagat tgtcagtgga tctgacgaca ccaaaagggc tcagg atg cta ctg ttg 57

Met Leu Leu Leu

1

caa gct ctc ctg ttc ctc tta atc ctg ccc agt cat gcc gaa gat gac 105

Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His Ala Glu Asp Asp

5

10

15

20

gtt act aca act gaa gag cta gct cct gct ttg gtc cct cca ccc aag 153

Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val Pro Pro Pro Lys

25

30

35

gga act tgt gca ggt tgg atg gca ggc atc cca gga cat cct ggc cac 201

Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly His

40

45

50

aat ggc aca cca ggc cgt gat ggc aga gat ggc act cct gga gag aag 249

Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu Lys

55

60

65

gga gag aaa gga gat gca ggt ctt ctt ggt cct aag ggt gag aca gga 297

Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro Lys Gly Glu Thr Gly

70

75

80

gat gtt gga atg aca gga gct gaa ggg cca cgg ggc ttc ccc gga acc 345

Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Thr

85

90

95

100

cct ggc agg aaa gga gag cct gga gaa gcc gct tat atg tat cgc tca 393

Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr Met Tyr Arg Ser

105

110

115

gcg ttc agt gtg ggg ctg gag acc cgc gtc act gtt ccc aat gta ccc 441

Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr Val Pro Asn Val Pro

120

125

130

att cgc ttt act aag atc ttc tac aac caa cag aat cat tat gac ggc 489

Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp Gly

135

140

145

agc act ggc aag ttc tac tgc aac att ccg gga ctc tac tac ttc tct 537

Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Ser

150

155

160

tac cac atc acg gtg tac atg aaa gat gtg aag gtg agc ctc ttc aag 585

Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe Lys

8/10

taacagaatg aaaatcacat ttggatatggg ggcttcacaa tattcgcatg actgtctgga 1069

agtagaccat gctatcttctc tgctcactgt acacaaatat tgttcacata aaccctataa 1129

tgtaaataatg aaatacagtg attactcttc tcacaggctg agtgatgaa tgtctaaaga 1189

cccataagta ttaaagtggg agggataaat tggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaaaact 1249

ttagagcaca ctggcggccg ttactag 1276

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His

1 5 10 15

Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val

20 25 30

Pro Pro Pro Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly

35 40 45

His Pro Gly His Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr

50 55 60

Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro Lys

65	70	75	80
Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly			
	85	90	95
Phe Pro Gly Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr			
	100	105	110
Met Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr Val			
	115	120	125
Pro Asn Val Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn			
	130	135	140
His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu			
145	150	155	160
Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val			
	165	170	175
Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr			
	180	185	190
Gln Glu Lys Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu			
	195	200	205
Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His			
	210	215	220
Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe			
225	230	235	240
Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn			
	245		

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年07月26日（26. 07. 2002）金曜日 10時56分48秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4. 17(v)及び51の2. 1(a) (v)）	本国際出願に関し、 科学技術振興事業団は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2001年07月31日 (31. 07. 2001)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	朝日新聞
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2001年08月01日 (01. 08. 2001)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	Nature Medicine, Volume 7, Number 8, August 2001.
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のため になされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/22, 45/00, 48/00, A61P3/10, 3/04, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/22, 45/00, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAMAUCHI T. et al., The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity, Nat Med., 2001, Vol.7, No.8, pages 941 to 946	1-4
X	Toshimasa YAMAUCHI et al., "Adiponectin ni yoru 2 Gata Tonyobyo no Insulin Teikosei no Kaizen", Experimental Medicine, 2001, Vol.19, No.17, pages 2301 to 2305	1-4
X	Haruhiko OSAWA et al., "2 Gata Tonyobyo Kanren Idenshi Gun no Kaimei", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2001, Vol.46, No.16, pages 2332 to 2336	1-4
X	Kazuo HARA et al., "Seikatsu Shukanbyo no Taylor Made Iryo", Igaku no Arumi, 2001, Vol.197, No.13, pages 1046 to 1048	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 22 October, 2002 (22.10.02)

Date of mailing of the international search report
 05 November, 2002 (05.11.02)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/22, 45/00, 48/00, A61P3/10, 3/04, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/22, 45/00, 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	YAMAUCHI T. 他, The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity, Nat Med., 2001, Vol. 7, No8, pages 941-946	1-4
X	山内敏正他, アディポネクチンによる2型糖尿病のインスリン抵抗性の改善, 実験医学, 2001, Vol. 19, No. 17, p. 2301-2305	1-4
X	大澤晴彦他, 2型糖尿病関連遺伝子群の解明, 蛋白質 核酸 酵素, 2001, Vol. 46, No. 16, p. 2332-2336	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.10.02

国際調査報告の発送日

05.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保



4 P 3124

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	原一雄他, 生活習慣病のテーラーメイド医療, 医学のあゆみ, 2001, Vol. 197, No. 13, p. 1046-1048	1-4